

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(51)

BUNDESREPUB*LIK* DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

A 23 k 1/00

DEUTSCHES  PATENTAMT

(52)

Deutsche Kl.: 53 g, 3/03

(10)

(11)

(21)

(22)

(43)

**Offenlegungsschrift 2 253 426**

Aktenzeichen: P 22 53 426.5-41

Anmeldetag: 31. Oktober 1972

Offenlegungstag: 30. Mai 1974

Ausstellungspriorität: —

(30)

Unionspriorität

(32)

Datum: —

(33)

Land: —

(31)

Aktenzeichen: —

(54)

Bezeichnung:

Futtermittel für Wiederkäuer und Verfahren zu seiner Herstellung

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder:

Maizena GmbH, 2000 Hamburg

Vertreter gem. § 16 PatG: —

(72)

Als Erfinder benannt:

Kropp, Ernst, Dipl.-Chem. Dr., Waterloo (Belgien);  
Witting, Reinert, Dipl.-Landw. Dr., 6730 Neustadt

(56)

Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

Prüfungsantrag gemäß § 28 b PatG ist gestellt

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DT-OS 2 018 717

GB-PS 1 257 112

DT-OS 2 024 869

FR-PS 1 508 332

GB-PS 1 280 922

FR-OS 2 038 108

DT-OS 2 127 072

GB-PS 1 251 483

DI 2 253 426

ORIGINAL INSPECTED

© 5.74 409 822/439

970

DR. MÖLLER-BORÉ DIPL.-PHYS. DR. MANITZ DIPL.-CHEM. DR. DEUFEL  
DIPL.-ING. FINSTERWALD DIPL.-ING. GRÄMKOW  
PATENTANWÄLTE

2253426

31. Okt. 1972

D/bg - M 2498

Maizena Gesellschaft mbH.  
2 Hamburg 1  
Spaldingstrasse 218

---

Futtermittel für Wiederkäuer und Verfahren zu seiner  
Herstellung

---

Die Erfindung betrifft ein Futtermittel für Wiederkäuer mit hohem Propionat- und Acetatgehalt und ein mikrobiologisches Verfahren zu seiner Herstellung durch Züchten von Propionsäurebildnern bzw. von Bakterien der Familie Propionibacteriaceae in dem beim Maisstärkegewinnungsprozess anfallenden Quellwasser.

Propionat- und acetathaltige Futtermittelzusätze gewinnen für die intensive Nutztierfütterung und -haltung zunehmend an Bedeutung.

Wirtschaftliche Verluste entstehen der Landwirtschaft und der Mischfutterindustrie immer wieder durch verdorbene Mischfuttermittel und Mischfutterkomponenten.

409822/0439

Unter den zahlreichen Faktoren, die zum Verderb dieser Produkte führen, haben Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze, eine besondere Bedeutung.

Insbesondere bei höheren Lagerungstemperaturen, bei längerer Lagerungszeit, bei einem Feuchtigkeitsgehalt von über 13 % und bei unsachgemässer Lagerung von Mischfuttermitteln und deren Komponenten, kann das Wachstum von Mikroorganismen sehr beschleunigt werden. Die Gefahr ist nicht zuletzt deshalb sehr gross, weil diese Mischfuttermittel und die zu ihrer Herstellung erforderlichen Komponenten zum Teil ideale Nährböden für die Entwicklung von Mikroorganismen darstellen.

Deshalb sucht die Mischfutterindustrie nach kostengünstigen und wirksamen Möglichkeiten, das Futter vor mikrobiellem Verderb zu schützen. Es ist bekannt, dass Propionsäure bakteriostatisch und fungistatisch wirkt. Nicht nur die freie Säure, sondern auch ihre Salze, wie Calciumpropionat, verhindern in einer Konzentration von etwa 0,3 % die mikrobiell verursachte Erhitzung bei Mischfuttermitteln und deren Komponenten. Auch Essigsäure und ihre Salze vermögen viele Bakterien und Schimmelpilze in ihrer Entwicklung zu hemmen.

Im Verdauungstrakt der Wiederkäuer werden die stickstofffreien Extraktstoffe der Futtermittel fast quantitativ zu den niederen Fettsäuren Essig-, Propion- und Buttersäure abgebaut. Diese organischen Säuren werden nach Eintritt in die Blutbahn in den Stoffwechsel des Wieder-

käuers eingeschleust und stellen die Ausgangssubstanz einmal für den Energiestoffwechsel und zum anderen für spezielle Syntheseprozesse dar. Hieraus geht die bedeutsame Rolle hervor, welche die Propionsäure und die Essigsäure in der Wiederkäuerernährung spielen.

Reicht die Propionsäurenachlieferung aus dem Pansen nicht aus, so erkranken insbesondere die Hochleistungsrinder sehr schnell an akuter oder latenter Acetonämie. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass orale Gaben von Propionsäure bzw. Propionat dieser Stoffwechselstörung entgegenwirken.

Ist die Essigsäurebildung im Pansen aufgrund von unsachgemässer Fütterung oder von sonstigen Faktoren unzureichend, sinkt der Fettgehalt in der Milch ab. Nach Verfütterung von Acetat stabilisiert sich der MilCHFettgehalt.

Der Wiederkäuer vermag mit Hilfe der in seinen Vormägen angesiedelten Mikroorganismen auch Stickstoff nicht eiweissartiger Natur (NPN) zu verwerten. Auf der Suche nach neuen für Wiederkäuer verwertbare N-Träger wurde von verschiedenen Autoren auch Ammoniumpropionat getestet. Wie aus den Untersuchungen übereinstimmend hervorgeht, wird der Stickstoff von Ammoniumpropionat ebenso gut wie der des Harnstoffes verwertet (bezogen auf gleiche N-Gehalte).

Wie nunmehr gefunden wurde, lässt sich ein geeignetes Futtermittel für Wiederkäuer mit hohem Propionat- und

Acetatgehalt in der Weise herstellen, dass in einem wässrigen Nährmedium, welches im wesentlichen Maisquellwasser als Kohlenstoffquelle und Ammoniak als Stickstoffquelle enthält, bei etwa 25 bis 30°C Propionsäurebildner anaerob gezüchtet werden, woraufhin das Fermentationsprodukt neutralisiert, eingedickt und gegebenenfalls in ein Trockenprodukt übergeführt wird.

Vorzugsweise enthält das Nährmedium als Kohlenstoffquelle etwa 10 bis etwa 15 % Maisquellwasser-Trockenmasse. Zusätzlich können ihm als Kohlenstoffquelle Zuckerarten in Form von Dextroseabläufen oder Melasse zugesetzt werden. Vor der Fermentation wird das Nährmedium mit Ammoniak als Stickstoffquelle auf einen pH-Wert im Bereich von 6,0 bis 7,0 eingestellt, und während der Fermentation wird dieser pH-Bereich durch Zugabe von Ammoniak aufrechterhalten.

Die Fermentation wird normalerweise etwa 1 bis 4 Tage durchgeführt. Im technischen Maßstab hat sich in den meisten Fällen eine Fermentationszeit von ca. 2 Tagen als zweckmässig erwiesen.

Vor dem Eindicken kann das Fermentationsprodukt mit Alkali-, Calcium- und/oder Magnesiumhydroxid und/oder -carbonat neutralisiert werden. Das eingedickte Fermentationsprodukt kann weiterhin vor dem Trocknen ggf. mit Maiskleber, Maisschalen und/oder Maiskeimölkuchen oder anderen Nebenprodukten der Getreideverarbeitung vermischt werden.

Für die Züchtung in den Nährmedien eignen sich insbesondere solche Stämme von Propionsäurebildnern, welche im wesentlichen nur Propionsäure und Essigsäure produzieren. Diese Eigenschaften besitzen beispielsweise Stämme von *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii*, *P. thoenii* oder *P. techniceum*.

Die positiven Wirkungen, die sich bei gezieltem Einsatz von Propionat und Acetat im Mischfutter und ihren Komponenten beim Verfüttern an Wiederkäuer erreichen lassen, sind an sich bekannt. Die genannten organischen Säuren werden deshalb auch vielfach in der Tierernährung eingesetzt. Die Verwendung von Propionat und Acetat in Form der erfindungsgemässen Futtermittel bringt der Mischfutterindustrie bzw. der Landwirtschaft jedoch folgende Vorteile:

1. Die Handhabung der Propionsäure und ihre Verteilung im Mischfutter bringen Schwierigkeiten mit sich und erfordern besondere Investitionen, da die Säure stark korrodierend wirkt. Der erfindungsgemässe propionathaltige Futtermittelzusatz lässt sich ohne Schwierigkeiten untermischen, so dass keine besonderen Investitionen vorgenommen werden müssen.
2. Die Salze der Propion- und Essigsäure sind kostenintensiv, so dass ihr Einsatz im Mischfutter im grösseren Umfang aus diesem Grunde in Frage gestellt ist. In Form des erfindungsgemässen Futtermittelzusatzes können sie preiswert angeboten werden.

3. Werden Propionat und Acetat in Form des der Erfindung zugrunde liegenden Futtermittelzusatzes dem Mischfutter zugesetzt, so kann eine sonst bei Geflügel- und Schweinefutter erforderliche zusätzliche Vitamin B<sub>12</sub>-Supplementierung entfallen.
4. Ammoniumpropionat ist wie Harnstoff hygroskopisch, so dass die Verarbeitung normalerweise Schwierigkeiten bereitet. Der der Erfindung zugrunde liegende Futtermittelzusatz ist relativ wenig hygroskopisch und lässt sich ohne Schwierigkeiten in Wiederkäuer-Mischfutter einbringen.

Durch die folgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

Beispiel 1: Stammauswahl und Vorkulturen

Für die Vorkulturen dienten mit Wattestopfen verschlossene Erlenmeyerkolben (100 ml, 1000 ml und 3000 ml). Zur Schaffung anaerober Bedingungen wurden die Kulturen mit n-Alkan-Gemisch überschichtet.

Stammauswahl

Von insgesamt 11 getesteten Stämmen von Propionsäurebildnern zeigten die nachfolgend aufgeführten Stämme eine relativ starke Propionsäurebildung und erwiesen sich für die Fermentation des Maisquellwassers als besonders geeignet.:



1. *P. freudenreichii*
2. *P. shermanii* St. Heinrich
3. *P. shermanii* PZ 3
4. *P. technicum*
5. *P. 51/ E*
6. *P. 91/ E*

Die genannten Stämme liegen bei der Gesellschaft für molekularbiologische Forschung mbH in Stöckheim über Braunschweig vor.

Die Anzucht der Propionsäurebildner wurde wie folgt vorgenommen:

a) Stichkultur

Jeder Stamm wurde 24 Stunden auf Micro-Assay-Culture-Agar als Stichkultur bei 30 °C bebrütet. Anschliessend wurde die Stichkultur mit je 2 ml Medium der 1. Vorkultur überschichtet, aufgeschwemmt und in 100 ml Gärmedium überführt.

b) 1. Vorkultur (100 ml):

Das Nährmedium für die 1. Vorkultur besass folgenden Nähr- und Wirkstoffgehalt:

Maisquellwasser (50 %ig)	40	g/l
Hefeextrakt	10	g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76	g/l
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76	g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,4	g/l
FeSO <sub>4</sub>	0,01	g/l
Biotin	0,3	mg/l
Ca-Pantothenat	4,0	mg/l
D-Glucose (50%ig)	30,0	ml/l

Nach Beimpfen von 100 ml Nährmedium mit 2 ml Abschwemmung aus der Stichkultur wurde es 24 Stunden bei 30°C bebrütet.

c) 2. Vorkultur (900 ml):

Das Nährmedium für die 2. Vorkultur wies folgenden Nähr- und Wirkstoffgehalt auf:

Maisquellwasser (50 %ig)	80 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 g/l
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,4 g/l
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g/l
Biotin	0,3 mg/l
Ca-Pantothenat	4,0 mg/l
D-Glucose	30,0 ml/l

Mit der 24-stündigen 1. Vorkultur wurden 900 ml Medium beimpft und wiederum 24 Stunden bei 30°C gehalten.

d) 3. Vorkultur (2 x 1500 ml):

Für jeden Stamm wurden zwei Ansätze je 1500 ml Maisquellwasser (50%ig) 10 Minuten bei 121°C sterilisiert, mit 10% igem Ammoniak auf pH 6,8 eingestellt und mit je 500 ml der 2. Vorkultur beimpft. Die 3. Vorkultur wurde 36 Stunden bei 30°C bebrütet. Diese beiden Kulturen mit je 2 l Gesamtvolumen wurden als Impfmateri-  
al für 9 l 10%iges Maisquellwasser im Fermenter verwendet (Versuch2).

Beispiel 2: Fermentation

Analytik

Das zur Verwendung kommende Maisquellwasser hatte folgende Zusammensetzung:

Trockensubstanz	56,7 %
Protein (i. Tr.)	47,1 %
Asche (i. Tr.)	15,2 %
pH	4,2

Die qualitative Bestimmung der Propionsäure und Essigsäure erfolgte nach Überführung in die Methylester auf gaschromatographischem Wege.

Der Gehalt an L (+)-Lactat wurde auf enzymatischem Wege unter Verwendung einer speziellen Hefe-Lactat-Dehydrogenase ermittelt.

D-Glucose wurde nach entsprechendem Verdünnen der Fermenter-Proben mit dest. Wasser mit Glucoseoxidase im Beckmann-Glucose-Analysator bestimmt.

Zur Ermittlung des Gehalts an D-Fructose wurde der Gehalt an reduzierenden Zuckern mit Anthron-Reagenz bestimmt.

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach Kjeldahl.

Zur Trübungsmessung (Zellwachstum) wurden die Fermenter-Proben 1 : 100 mit dest. Wasser verdünnt. Dann wurde bei 578 nm im Eppendorf-Photometer die Extinktion gemessen.

### Durchführung der Fermentation

Je 9 l 10%iges Maisquellwasser wurden, ggf. nach dem Vermischen mit einer aliquoten Menge Dextroseabläufe (Tabelle 1) oder Rohrzuckermelasse (Tabelle 2) 2 x je 5 min bei 121°C sterilisiert und in einen Fermenter der AG für Biologische Verfahrenstechnik (Basel) übergeführt, der über eine automatische Temperaturregelung und pH-Steuerung verfügte. Der pH-Wert wurde mit Ammoniak auf 6,8 eingestellt. Dann wurde mit je 2 l einer 3. Vorkultur (Beispiel 1 d) beimpft und zur Schaffung anaerober Bedingungen mit 300 ml n-Alkan-Gemisch überschichtet. Ein tief angebrachter Blatt-rührer ermöglichte ein leichtes Umrühren während der bei 30°C durchgeführten Fermentation. Gleichzeitig wurde der durch die Bildung der niedrigen Fettsäuren absinkende pH-Wert durch Zugabe von Ammoniak automatisch auf 6,8 gehalten.

Zu Beginn jeden Versuchs, nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Gehalt an Propionsäure, Essigsäure, Natriumlactat, Stickstoff, D-Glucose, D-Fructose und die Trübung (Zellwachstum) bestimmt. Dabei wurden zur Ermittlung des Stickstoff-, Essigsäure-, Glucose- und Fructose-Gehalts je 200 ml der Fermenterbrühe gefriergetrocknet.

### Auswertung der Ergebnisse

Mit allen 6 Stämmen von Propionsäurebildnern, die sich für die Fermentation von Maisquellwasser als besonders geeignet erwiesen hatten (Beispiel 1) wurden gute Er-

gebnisse erzielt. Nachfolgend sind die Resultate festgehalten worden, die mit den Stämmen *P. shermanii* PZ 3 (Tabelle 1) und *P. technicum* (Tabelle 2) erhalten wurden. (Tab. 1 u. 2)

In den Tabellen 3 und 4 sind die in den Tabellen 1 und 2 erhaltenen Ergebnisse auf die Trockensubstanz des Ausgangsmaterials bezogen worden. Wie hieraus zu ersehen ist, wurde mit *P. shermanii* PZ 3 nach einer Fermentationszeit von 72 Stunden eine Propionsäureausbeute von 16,50 % erzielt, wenn 10 % Maisquellwasser als einzige Kohlenstoffquelle des Nährmediums verwendet wurde. Durch Zusatz von zusätzlich 8 % Dextroseabläufen konnte die Propionsäureausbeute auf 18,50 % gesteigert werden. Mit *P. technicum* wurde mit 10 % Maisquellwasser als einziger Kohlenstoffquelle bereits nach 48 Stunden eine Propionsäureausbeute von 17,50 % erreicht, die sich auch bei längerer Fermentation kaum noch steigern liess. Durch Zusatz von zusätzlich 2 % Rohrzuckermelasse wurde mit diesem Stamm in 72 Stunden eine Propionsäureausbeute von 19,25 % erreicht. (Tab. 3 u. 4).

Tabelle 1

2253426

Ergebnis der Fermentationsversuche mit P. shermanii PZ 3

Versuch 1		a	b	c
Ausgangsmaterial	(g/l)	100	140	180
Maisquellwasser Tr.	( % )	10	10	10
Dextroseabläufe Tr.	( % )	0	4	8
Zusammensetzung:		Std.		
Propionsäure (g/l)	0	0,5	0,6	0,5
	24	6,0	7,5	8,3
	48	10,7	17,7	13,2
	72	16,5	24,3	33,3
Na-Lactat (g/l)	0	19,7	15,5	17,6
	24	8,9	7,3	7,1
	48	4,2	5,3	5,7
	72	3,4	5,7	5,9
Glucose (g/l)	0	4,6	8,6	15,8
	24	0,3	6,3	22,1
	48	0,1	0,2	15,1
	72	0,1	0,2	1,6
Trübungsmessung bei 578 nm (1:100 verdünnt)	0	0,230	0,282	0,307
	24	0,250	0,345	0,370
	48	0,295	0,515	0,546
	72	0,346	0,454	0,680
Stickstoff (%) <sup>+</sup>	72	9,5	7,5	6,6
Essigsäure (%) <sup>+</sup>	72	8,65	6,05	6,35

<sup>+</sup> in der gefriergetrockneten Fermenterbrühe

409822/0439

Tabelle 2

Ergebnis der Fermentationsversuche mit P. techniceum

Versuch 2		a	b	c
Ausgangsmaterial	(g/l)	100	120	140
Maisquellwasser Tr.	( % )	10	10	10
Rohrzuckermelasse Tr.	( % )	0	2	4
Zusammensetzung:		Std.		
Propionsäure	(g/l)	0	0,0	0,0
		24	14,6	15,9
		48	17,5	21,4
		72	17,7	23,1
Na-Lactat	(g/l)	0	19,3	21,6
		24	12,0	7,0
		48	1,9	2,9
		72	1,1	2,2
Glucose	(g/l)	0	1,4	6,5
		24	0,8	1,7
		48	0,7	0,7
		72	0,7	0,6
Trübungsmessung bei 578 nm (1:100 verdünnt)		0	0,140	0,154
		24	0,181	0,171
		48	0,262	0,356
		72	0,244	0,357
Stickstoff	(%) +	72	9,9	8,8
Essigsäure	(%) +	72	8,70	8,85
D-Glucose	(%) +	72	0,01	0,15
D-Fructose	(%) +	72	0,1	0,6

409822/0439

+ in der gefriergetrockneten Fermenterbrühe

Tabelle 3

Ergebnis der Fermentationsversuche mit P. shermanii PZ 3  
 (bezogen auf Trockensubstanz des Ausgangsmaterials)

Versuch 1		a	b	c
Ausgangsmaterial	(g/l)	100	140	180
Maisquellwasser Tr.	( % )	10	10	10
Dextroseabläufe Tr.	( % )	0	4	8
Zusammensetzung:		Std.		
Propionsäure (%)	0	0,50	0,43	0,28
	24	6,00	5,36	4,62
	48	10,70	12,65	7,33
	72	16,50	17,35	18,50
Na-Lactat (%)	0	19,70	11,08	9,88
	24	8,90	5,22	3,95
	48	4,20	3,79	3,17
	72	3,40	4,07	3,28
Glucose (%)	0	4,60	6,14	8,78
	24	0,30	4,50	12,28
	48	0,10	0,14	8,39
	72	0,10	0,14	0,89

409822/0439



Tabelle 4

Ergebnis der Fermentationsversuche mit *P. technicum*  
(bezogen auf Trockensubstanz des Ausgangsmaterials)

Versuch 2		a	b	c
Ausgangsmaterial (g/l)		100	120	140
Maisquellwasser Tr. ( % )		10	10	10
Rohrzuckermelasse Tr. ( % )		0	2	4
Zusammensetzung:		Std.		
Propionsäure (%)	0	0,00	0,00	0,00
	24	14,60	7,92	11,37
	48	17,50	17,84	6,78
	72	17,70	19,25	17,56
Na-Lactat (%)	0	19,30	18,00	11,28
	24	12,00	5,84	4,72
	48	1,90	2,42	1,79
	72	1,10	1,63	0,86
Glucose (%)	0	1,40	5,42	8,50
	24	0,80	1,42	5,28
	48	0,70	0,58	0,50
	72	0,70	0,50	0,43

409822/0439

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung eines Futtermittels für Wiederkäuer mit hohem Propionat- und Acetatgehalt auf mikrobiologischem Wege dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass in einem wässrigen Nährmedium, welches im wesentlichen Maisquellwasser als Kohlenstoffquelle und Ammoniak als Stickstoffquelle enthält, bei etwa 25 bis 30°C Propionsäurebildner anaerob gezüchtet werden, woraufhin das Fermentationsprodukt neutralisiert, eingedickt und gegebenenfalls in ein Trockenprodukt übergeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass das Nährmedium als Kohlenstoffquelle etwa 10 bis etwa 15 % Maisquellwasser-Trockenmasse enthält und mit Ammoniak als Stickstoffquelle vor der Fermentation auf einen pH-Wert im Bereich von 6,0 bis 7,0 eingestellt wird, und dass während der Fermentation dieser pH-Bereich durch Zugabe von Ammoniak aufrechterhalten wird.
3. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass das Nährmedium als zusätzliche Kohlenstoffquelle Zuckerarten in Form von Dextroseabläufen oder Melasse enthält.
4. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass das Fer-

mentationsprodukt vor dem Eindicken mit Alkali-, Calcium- und/oder Magnesiumhydroxid und/oder -carbonat neutralisiert wird.

5. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass das eingedickte Fermentationsprodukt vor dem Trocknen ggf. mit Maiskleber, Maisschalen und/oder Maiskeimölkuchen oder Maiskeimextraktionsschrot oder anderen Nebenprodukten der Getreideverarbeitung vermischt wird.

6. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass solche Stämme von Propionsäurebildnern in dem Nährmedium gezüchtet werden, welche im wesentlichen Propionsäure und Essigsäure produzieren.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Propionsäurebildner ausgewählte Stämme von Propionibacterium freudenreichii, P. shermanii, P. thoenii oder P. techniceum verwendet werden.

8. Futtermittel für Wiederkäuer mit hohem Propionat- und Acetatgehalt, hergestellt auf mikrobiologischem Wege durch anaerobe Züchtung von Propionsäurebildnern in einem wässrigen Nährmedium, welches im wesentlichen Maisquellwasser als Kohlenstoffquelle und Ammoniak als Stickstoffquelle enthält, nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

Int. Cl.: A 23k, 1/00

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**  
**GERMAN [LOGO] PATENT OFFICE**

German Class: 53g, 3/03

[see source for item numbers]

**Published Application 2 253 426**

File No.: P 22 53 426.5-41  
Date of application: October 31, 1972  
Date of publication: May 30, 1974

Issuance priority: -

Union priority

Date: -

Country: -

File No.: -

---

Title: Feed for ruminants, and method for its production

Addition to: -

Exclusion from: -

Applicant: Maizena GmbH, 2000 Hamburg

Agent acc. to Article

16 of the Patent Act: -

Named as inventor: Kropp, Ernst, B.S.-Chem., Dr., Waterloo (Belgium);  
Witting, Reinert, B.S.-Agriculture, Dr., 6730 Neustadt

---

Research application according to Article 28a of the Patent Act has been filed  
Examination application according to Article 28b of the Patent Act has been filed  
Publications to be considered for the evaluation of patentability:

DT-OS 2 018 717	GB-PS 1 257 112
DT-OS 2 024 869	FR-PS 1 508 332
GB-PS 1 280 922	FR-OS 2 038 108
DT-OS 2 127 072	GB-PS 1 251 483

DT 2 253 426

[stamp:] ORIGINAL INSPECTED  
DR. MÜLLER-BORÉ, B.S.-PHYS. DR. MANITZ, B.S.-CHEM Dr. DEUFEL,  
B.S.-ENG. FINSTERWALD, B.S.-ENG. GRAMKOW  
PATENT ATTORNEYS

2253426

Oct. 31, 1972  
D/bg – M 2198

Maizena Gesellschaft mbH.  
2 Hamburg 1  
Spaldingstrasse 218

---

Feed for Ruminants, and Method for its  
Production

---

The invention relates to a feed for ruminants with a high content of propionate and acetate, and a microbiological method for its production by means of growing propionic acid generators, or by means of bacteria of the propioni bacteriaceae family in the spring water accumulated during the cornstarch extraction.

Feed additives containing propionate and acetate are becoming increasingly important for intensive feeding and keeping of productive livestock.

Over and over again agriculture and the mixed feed industry experiences economic losses due to spoiled mixed feed and mixed feed components.

409822/0439

Among numerous factors leading to the spoilage of these types of products, microorganisms, such as bacteria and fungi, take on a particular role.

The growth of microorganisms can be accelerated especially with higher storage temperatures, during longer storage times, moisture content of more than 13%, and with improper storage of mixed feed and its components. Last but not least, the risk is very high because this type of mixed feed, as well as the components necessary for its production, partially represents an ideal breeding ground for the development of microorganisms.

That is why the mixed feed industry is searching for inexpensive and effective possibilities of protecting the feed from microbial spoilage. It is known that propionic acid has a bacteriostatic and fungistatic effect. Not only for the free acid, but also for its salts, such as calcium propionate, they prevent the microbially caused heating of mixed feed and its components at a concentration of about 0.3%. Acetic acid and its salts are also able to block many bacteria and molds from developing.

The nitrogen-free extracts of the feed are degraded almost quantitatively to the low fatty acids of acetic, propionic, and butyric acid in the digestive tract of the ruminants. After transferring into the bloodstream, these organic acids are infiltrated into the metabolism

of the ruminant, and represent the base substance both for the energy metabolism, and for special synthesis processes. This results in the important role the propionic and acetic acids play in the ruminants' nutrition.

If the propionic acid supply of the rumen is not sufficient, especially high-efficiency cattle will very rapidly fall ill of acute or latent acetonaemia. Several trials have shown that the oral administration of propionic acid, or propionate respectively, counteract this metabolic disorder.

If the acetic acid formation is insufficient in the rumen due to improper feeding, or due to other factors, the fat content in the milk declines. After the feeding of acetate, the milk fat content stabilizes.

The ruminant is able to dispose of nitrogen, even of non-protein nature (NPN) with the aid of microorganisms resident in its omasums. In the search of new N carriers that are utilizable for ruminants, several different authors also tested ammonium propionate. As the tests concurrently confirm, nitrogen is disposed of by ammonium propionate just as well as that of the urea (based on the same N contents).

As has now been found, a suitable feed with a high propionate and acetate content can be produced for ruminants in such a way

that propionic acid generators are bred anaerobically at about 25 to 30°C in a watery growing medium, which essentially contains corn spring water as the carbon source, and ammonia as the nitrogen source, whereupon the fermentation product is neutralized, coagulated, and if necessary, transferred into a dry product.

Preferably, the growing medium contains about 10 to about 15% of corn spring water dry matter as the carbon source. Additionally, as the carbon source, sugar types in the form of dextrose sequences, or molasses can be added. Before the fermentation process, the growing medium is adjusted to a pH value within a range of 6.0 to 7.0 with ammonia as the nitrogen source, and this pH range is maintained during the fermentation process by adding ammonia.

The fermentation process is normally performed for 1 to 4 days. At a technical scale, a fermentation time of approximately 2 days has proven appropriate in most cases.

Before the coagulation, the fermentation product can be neutralized with alkali, calcium, and/or magnesium hydroxide, and/or –carbonate. If necessary, the coagulated fermentation product additionally can be mixed with corn adhesive, cornhusks, and/or corn oil cake, or other byproducts of grain processing before the drying process.



Strains, such as those of propionic acid generators, which essentially produce only propionic acid and acetic acid, are especially suitable for the breeding in a growing medium. Strains of propioni bacteria freudenreichii, P. shermanii, P. thoenii, or P. techniceum, for example, possess these properties.

The positive effects that can be achieved with the targeted use of propionate and acetate in mixed feed, and its components with the feeding to ruminants are generally known. The said organic acids are therefore used in many cases in animal nutrition. The use of propionate and acetate in the shape of the feed according to the invention, however, supplies the following advantages to the mixed feed industry, or to agriculture:

1. The handling of propionic acid and its distribution in mixed feed have inherent difficulties, and require considerable investments, because acid has a strong corroding effect. The feed additive containing propionate according to the invention can be mixed without any problems so that no special investments must be undertaken.
2. The salts of propionic and acetic acid are intensive in cost so that their use in mixed feed at a larger scale is questionable for this reason. They can be supplied low in cost in the form of the feed additive according to the invention.

3. If propionate and acetate are added to the mixed feed in the form of the feed additive based on the invention, an otherwise required additional Vitamin B<sub>12</sub> supplementation for poultry and pig feed can be omitted.
4. Like urea, ammonium propionate is hygroscopic so that the processing normally poses no problems. The feed additive based on the invention is relatively little hygroscopic, and can be added to the ruminant mixed feed without any difficulties.

The invention is explained in further detail by means of the following examples.

Example 1: Strain Selection and Preparatory Cultures

Erlenmyer flasks (100 ml, 1000 ml, and 3000 ml) sealed with cotton plugs served as the vessels for the preparatory cultures. In order to create anaerobic conditions, the cultures were coated with a mixture of n-alkane.

Strain Selection

Of a total of 11 tested strains of propionic acid generators, the following strains showed a relatively strong propionic acid formation, and proved to be particularly suitable for the fermentation of corn spring water:

1. P. freudenreichii
2. P. shermanii St. Heinrich
3. P shermanii PZ 3
4. P. techniceum
5. P. 51/ E
6. P. 91/ E

The said strains are recorded at the Organization for Molecular-Biological Research mbH at Stöckheim über Braunschweig.

The starting of the propionic acid generator was performed as follows:

a) Stab Culture

Each strain was bred for 24 hours as a stab culture on micro-assay culture agar at 30°C. Subsequently, the stab culture was coated each with 2 ml of medium of the first preparatory culture, suspended, and transferred into 100 ml of a fermenting medium.

b) 1<sup>st</sup> Preparatory Culture (100 ml):

The growing medium for the 1<sup>st</sup> preparatory culture had the following nutrition and active ingredient contents:

Corn spring water (50%)	40	g/l
Yeast extracts	10	g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76	g/l
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1.76	g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.4	g/l
FeSO <sub>4</sub>	0.01	g/l
Biotin	0.3	mg/l
Ca-pantothenate	4.0	mg/l
D-glucose (50%)	30.0	ml/l

After the inoculation of 100 ml of growing medium with 2 ml of avulsion from the stab culture, it was incubated for 24 hours at 30°C.

c) 2<sup>nd</sup> Preparatory Culture (900 ml):

The growing medium for the 2<sup>nd</sup> preparatory culture had the following nutrition and active ingredient contents:

Corn spring water (50%)	80	g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76	g/l
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1.76	g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.4	g/l
FeSO <sub>4</sub>	0.01	g/l
Biotin	0.3	mg/l
Ca-pantothenate	4.0	mg/l
D-glucose (50%)	30.0	ml/l

With the 24-hour 1<sup>st</sup> preparatory culture, 900 ml of medium was inoculated, and maintained at 30°C for an additional 24 hours.

d) 3<sup>rd</sup> Preparatory Culture (2 x 1500 ml):

Two precursors of 1500 ml of corn spring water (50%) were sterilized for 10 minutes at 121°C for each strain, adjusted to a pH value of 6.8 with 10% ammonia, and inoculated with 500 ml each of the 2<sup>nd</sup> preparatory culture. The 3<sup>rd</sup> preparatory culture was incubated for 36 hours at 30°C. These two cultures with a total volume of 2 liters each were used as the inoculation material for 9 liters of 10% corn spring water in the fermenter (trial 2).

Example 2: Fermentation  
Analysis

The corn spring water used had the following composition:

Dry substance	56.7%
Protein (i. Tr.)	47.1%
Ash (i. Tr.)	15.2%
pH	4.2

The qualitative determination of propionic acid and acetic acid occurred after the transfer into methylester by means of the gas-chromatographical way.

The content of L (+) lactate was detected by means of the enzymatic way by using a special yeast-lactate-dehydrogenises.

D-glucose was determined after the fermenter samples were respectively diluted with distilled water containing glucoseoxidasis in the Bockmann glucose analyzer.

In order to determine the contents of D-fructose, the content of reducing sugars was determined by means of enthrone reagent.

The nitrogen determination occurred by means of the Kjeldahl method.

In order to measure clouding (cell growth), the fermenter samples were diluted 1:100 with distilled water. Then the extinction was measured at 578 nm in the Eppendorf photometer.

### Performance of Fermentation

9 liters of 10% corn spring water each, if necessary after mixing it with a universal amount of dextrose sequences (table 1) or sucrose molasses (table 2), was sterilized 2 x for 5 min. each at 121°C, and transferred into a fermenter of the company AG for Biological Engineering (Basel), which was equipped with an automatic temperature control and pH control. The pH value was adjusted to 6.8 with ammonia. Then an inoculation with 2 liters each of a 3<sup>rd</sup> preparatory culture (example 1 d) was performed, and it was coated with 300 ml of an n-alkane mixture in order to create anaerobe conditions. A two flat-blade paddle impeller deeply inserted enabled the ease of stirring during the fermentation performed at 30°C. At the same time the pH value decreasing due to the formation of low fatty acids was automatically maintained at 6.8 by means of adding ammonia.

At the beginning of each trial, after 24, 48, and 72 hours, the content of propionic acid, acetic acid, sodium lactate, nitrogen, D-glucose, D-fructose, and the clouding (cell growth) was determined. In order to determine the content of nitrogen, acetic acid, glucose, and fructose, 200 ml each of the fermenter stock was freeze-dried.

### Evaluation of the Results

Good results were achieved in all 6 strains of propionic acid generators that had proven especially suitable for the fermentation of corn spring water (example 1).

The results achieved with the strains *P. shermanii* PZ 3 (table 1) and *P. technicum* (table 2) are listed below. (Tables 1 and 2)

Tables 3 and 4 the results achieved in tables 1 and 2 were based on the dry substance of the base material. As is obvious, a propionic acid yield of 16.50% was achieved after a fermentation time of 72 hours using *P. shermanii* PZ 3, if 10% corn spring water was used as the only carbon source of the growing medium. By adding an additional 8% of dextrose sequences the propionic acid yield could be increased to 18.50%. Using *P. technicum* achieved a propionic acid yield of 17.50 using 10% corn spring water as the only carbon source after 48 hours already, which could scarcely be increased even with a longer fermentation time. By adding an additional 2% of sucrose molasses a propionic acid yield of 19.25% was achieved after 72 hours using this strain. (Tables 3 and 4).

Table 1

Results from the Fermentation Trials using *P. shermanii* PZ 3

[see source for table]

Trial 1

Base material

Corn spring water Tr.

Dextrose sequences Tr.

Composition hrs.

Propionic acid

Na-lactate

Glucose

Clouding measurement

At 578 nm

(1:100 diluted)

Nitrogen

Acetic acid

+ in the freeze-dried fermentation stock

409822/0439



Table 2

Results from the Fermentation Trials using P. techniceum

[see source for table]

Trial 2

Base material

Corn spring water Tr.

Sucrose molasses Tr.

Composition:                      hrs.

Propionic acid

Na-lactate

Glucose

Clouding measurement

At 578 nm

(1:100 diluted)

Nitrogen

Acetic acid

D-glucose

D-fructose

+ in the freeze-dried fermentation stock

Table 3

Results from the Fermentation Trials using *P. shermanii* PZ 3  
(based on the dry substance of the base material)

[see source for table]

Trial 1

Base material

Corn spring water Tr.

Dextrose sequences Tr.

Composition:                      hrs.

Propionic acid

Na-lactate

Glucose

Table 4

Results from the Fermentation Trials using P. techniceum  
(based on the dry substance of the base material)

[see source for table]

Trial 2

Base material

Corn spring water Tr.

Sucrose molasses Tr.

Composition:                      hrs.

Propionic acid

Na-lactate

Glucose

Patent Claims

1. Method for the production of a feed for ruminants with a high propionate and acetate content in the microbiological way, characterized in that propionic acid generators are bred anaerobically at about 25 to 30°C in a watery growing medium, which essentially contains corn spring water as the carbon source, and ammonia as the nitrogen source, whereupon the fermentation product is neutralized, coagulated, and if necessary, transferred into a dry product.
2. Method according to claim 1, characterized in that the growing medium as the carbon source contains about 10 to about 15% of corn spring water dry matter, and is adjusted to a pH value within a range of 6.0 to 7.0 with ammonia as the nitrogen source before the fermentation process, and that this pH range is maintained during the fermentation process by adding ammonia.
3. Method according to the previous claims, characterized in that the growing medium contains sugar types in the form of dextrose sequences or molasses as an additional carbon source.
4. Method according to the previous claims, characterized in that the

409822/0439

fermentation product is neutralized using alkali, calcium, and/or magnesium hydroxide, and/or –carbonate before the coagulation process.

5. Method according to the previous claims, characterized in that the coagulated fermentation product is mixed with corn adhesive, cornhusks, and/or corn oil cake or corn extraction grain, or other byproducts of grain processing, if necessary, before the drying process.

6. Method according to the previous claims, characterized in that such strains of propionic acid generators are bred in the growing medium, which essentially produces propionic acid and acetic acid.

7. Method according to claim 6, characterized in that strains of propioni bacteria freudenreichii, P. shermanii, P. thoenii, or P. technicum selected as the propionic acid generators are used.

8. Feed for ruminants with a high content of propionate and acetate, produced in the microbiological way by means of anaerobic breeding of propionic acid generators in a watery growing medium, which essentially contains corn spring water as the carbon source, and ammonia as the nitrogen source, according to one of the previous claims.